

Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e menadiona em células de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741*Oxidative stress induced by hydrogen peroxide and menadione in Saccharomyces cerevisiae BY4741 Cells*Lázaro Gonçalves Cuinica^{1,2}¹ Faculdade de Ciências Naturais, Matemática e Estatística, Universidade Rovuma, Nampula-Moçambique.² Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto-Portugal.Autor para correspondência (*Author for correspondence*): lcuinica@unirovuma.ac.mz & lcuinica2010@gmail.com**Resumo**

O estresse oxidativo é uma irregularidade fisiológica considerada uma das responsáveis pelo envelhecimento do organismo humano e fator de risco para diversas doenças na maioria dos mamíferos. Nesta pesquisa avaliaram-se os efeitos do stress oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e menadiona em células de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. A cultura de células foi submetida em diferentes condições de stress por uma hora. A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi analisada em gel de poliacrilamida nativo, a atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi avaliada através de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto) a 340 nm, e a carbonilação de proteínas foi avaliada por quimioluminescência. Constatou-se que 5 mM do H₂O₂ e da menadiona induziram alta redução da atividade enzimática de SOD e GAPDH, e elevou a taxa de carbonilação de proteínas.

Palavras-chave: Células de *Saccharomyces cerevisiae*, Estresse oxidativo, Peróxido de hidrogênio, Menadiona.**Abstract**

Oxidative stress is a physiological irregularity, which is regarded to be one of the responsible for the human aging, as well as a risk factor for many diseases in most mammals. This study evaluated the effects of the oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) and menadione in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 cells. Cell culture was submitted to different stress conditions for one hour. Superoxide dismutase (SOD) activity was analyzed on native polyacrylamide gel, the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) activity was assessed by NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydride) at 340 nm, and protein carbonylation was evaluated by chemiluminescence. The findings show that 5 mM of H₂O₂ and menadione reduced the enzymatic activity of SOD and GAPDH. Furthermore, the rate of protein carbonylation increased

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae* cells, Oxidative stress, Hydrogen peroxide, Menadione.

INTRODUÇÃO

O oxigênio (O_2) é essencial para a vida, mas pode apresentar um caráter tóxico (Barreiros & David, 2006). Os organismos dependem do O_2 para as reações de oxidação nas vias de formação de trifosfato de adenosina (ATP - *Adenosine triphosphate*), destoxificação e biossíntese (Barreiros & David, 2006). Porém, quando o O_2 atua como um receptor de elétrons, em diversos processos enzimáticos e não enzimáticos, é transformado em radicais livres de oxigênio, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxilo (OH^{\cdot}), espécies químicas bastante reativas e tóxicas (De-Groot, 1994; Fridovich, 1997; Halliwell & Whiteman, 2004).

A principal fonte de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) é a respiração mitocondrial (Toykuni, 1999). Outras fontes endógenas incluem o metabolismo por ação das oxirredutases, e as exógenas incluem principalmente o fumo do cigarro, poluentes atmosféricos, aditivos e conservantes alimentares (Klings & Farber, 2001). A presença de ROS nos processos metabólicos ou na cadeia respiratória pode conduzir a diversos danos na célula, como oxidação lipídica, carbonilação de proteínas e danos oxidativos no DNA, contribuindo para o envelhecimento, morte celular e aparecimento de doenças degenerativas (Mccord, 1998; Nakazawa et al., 1996).

Os principais agentes causadores de estresse oxidativo são os radicais OH^{\cdot} , uma vez que um aumento dos níveis de radicais superóxido, H_2O_2 ou íons metálicos de atividade redox (*Cu e Fe*) está associado à produção de altos níveis de radicais OH^{\cdot} (Breitenbach & Eckl, 2015).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) resulta da reação de destoxificação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Sies, 1995). Apesar de não ser um radical de O_2 , o seu potencial de toxicidade está associado à fácil redução deste composto a radicais OH^{\cdot} , pela reação de Fenton, ou pela reação de Haber-Weiss (Lane, 2011).

A menadiona constitui uma quinona, podendo contribuir para o aumento da produção de ROS. As quinonas podem ser reduzidas a semi-quinonas, complexos muito instáveis e reativos que reagem com o O_2 , regenerando a quinona e reduzindo-o a ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Criddle et al, 2006). Este, por sua vez, pode ser convertido a H_2O_2 ou OH^{\cdot} . O H_2O_2 uma vez formado deve ser reduzido a H_2O para prevenir a formação do radical OH^{\cdot} . A catalase destrói o H_2O_2 tal como moléculas da família das peroxidases, encontrando-se presente ao nível dos peroxissomas e em menor quantidade no citosol e nos microsomas da célula (Caetano, 2016; Criddle et al., 2006).

Sob condições fisiológicas normais, os danos celulares são prevenidos por defesas antioxidantes celulares que destroem as ROS (*defesas primárias*) e pela reparação de danos moleculares ou degradação de moléculas oxidadas (*defesas secundárias*) (Davies, 2000; Halliwell, 1990). Porém, sob certas condições de stress, os níveis de ROS excedem a capacidade antioxidante da célula, provocando situações de estresse oxidativo. Este desequilíbrio pode resultar de uma diminuição de antioxidantes, por diminuição da sua disponibilidade, e/ou de um aumento da produção de ROS (Caetano, 2016; Sies, 1986). Para a destoxificação ou redução de altos níveis das ROS participam várias enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutatona (Davies, 2000).

Na cadeia respiratória, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é produzido ao nível do complexo I e III, presentes na membrana mitocondrial (Rahman et al., 2012). A SOD constitui uma das enzimas de defesa primária e catalisa a conversão do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 , o qual não é tóxico, mas poderá ser convertido a outras ROS na célula (Poljsak & Milisav, 2013). Nos eucariotas esta enzima existe sob três isoformas: CuZnSOD, MnSOD e SOD extracelular. A enzima CuZnSOD é a mais abundante, estando presente em 90% das células, no citosol e no espaço intermembranar, enquanto que a enzima MnSOD está presente na membrana mitocondrial (Poljsak & Milisav, 2013).

A enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) catalisa a conversão de gliceraldeído 3-fosfato na reação da glicólise, degradando a glicose em glicerol e piruvato e resultando na formação de NADH (Temple et al., 2005). Em condições de estresse oxidativo, esta enzima é rapidamente inativada e a degradação da glicose vai ser realizada pela via das pentoses fosfato, ocorrendo a formação de NADPH em vez de NADH (Temple et al., 2005). O fato de se produzir NADPH em situações de estresse oxidativo é vantajoso para a célula porque vai ser utilizado na redução de glutatona dissulfeto (GSSH) à glutatona reduzida (GSH), pela enzima glutatona redutase (GR). A glutatona é uma das principais defesas do organismo para proteção contra o estresse oxidativo e pode atuar em vários processos celulares de destoxificação, como é o caso da redução do H₂O₂ (Mannervik, 1985). Nesta reação, catalisada pela glutatona peroxidase (GPx), o grupo reativo sulfidrílico da glutatona reduz o H₂O₂ em H₂O e os peróxidos lipídicos a álcoois não tóxicos, pela oxidação de duas moléculas de glutatona e formação de uma molécula de glutatona dissulfeto (Gaetani, 1989).

Várias modificações proteicas ocorrem devido à oxidação de cofactores 4Fe-4S (*centros ativos de muitas enzimas*) e de aminoácidos contendo enxofre, ligações entre resíduos de tirosina, interconversão de aminoácidos, formação de aductos com produtos resultantes da peroxidação de lípidos e a carbonilação de proteínas (Yu, 1994). A formação de grupos carbonilo na proteína resulta da oxidação irreversível de aminoácidos específicos (*lisina, prolina, histidina e arginina*) e pode ser quantificada por ensaios espectrofotométricos ou por ensaios imunológicos (Yu, 1994).

OBJETIVO

Este estudo avaliou o potencial oxidativo do peróxido de hidrogênio e da menadiona em células de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (Porto, Portugal). A cultura de células de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, inoculadas em meio de cultura YPD, foram submetidas a diferentes condições de estresse durante 60 minutos, na fase exponencial de crescimento. Nesta atividade laboratorial foram usadas 5 amostras, sendo 1 o controle (sem Menadiona nem H₂O₂) (Tabela 1), tendo sido usadas concentrações de 0,5 mM (*dose sub-letal*) e 5 mM (*dose letal*) dos oxidantes menadiona e H₂O₂.

Tabela 1. Condições de estresse oxidativo em que as células de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 foram submetidas.

Table 1. Conditions of oxidative stress in which *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 cells were submitted.

Amostra	Oxidante	Concentração (mM)
1	Controle	0,0
2	Menadiona	0,5
3	Menadiona	5,0
4	H ₂ O ₂	0,5
5	H ₂ O ₂	5,0

Determinação da Concentração de Proteínas

Após tratamento das células com as diferentes condições de estresse, os níveis de proteína foram determinados usando o método de Lowry, o qual se baseia na formação de um complexo de cobre-proteína e na redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelos resíduos de tirosina e triptofano das proteínas, resultando num composto com absorção máxima em 750 nm (Breitenbach, 2015). A concentração de proteínas das amostras ilustrada na Tabela 2 foi determinada pela equação da reta padrão ($y = 0,005x + 0,0055$) em 750 nm, a 0,5 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) correspondente a 20 - 60 µg de BSA.

Tabela 2. Concentração de proteínas nas amostras, determinada pela curva de calibração a 750 nm.
Table 2. Proteins concentration, determined by the calibration curve at 750 nm.

Amostra	1	2	3	4	5	BSA* P0	BSA P1**	BSA P2	BSA P3
Abs ₇₅₀	0,216	0,193	0,195	0,187	0,155	-	0,110	0,209	0,297
Proteína (µg)	42,1	37,5	37,9	36,3	29,9	0	20	40	60
Volume (µL)	4	4	4	4	4	-	40	80	120
Proteína (µg/µL)	10,50	9,37	9,47	9,08	7,47	-	-	-	-

* BSA = Bovine Serum Albumin.

** P0: sem proteínas, P1: com 20 µg de proteínas, P2: com 40 µg de proteínas, P3: com 60 µg de proteínas.

Análise da atividade da Superóxido dismutase

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi detectada *in situ* após a separação das proteínas em gel de poli(acrilamida) nativo. Nestas condições, as proteínas não são desnaturadas e a sua separação é feita em função da massa molecular e da carga. A riboflavina reduz fotoquimicamente o O₂ ao radical superóxido (O₂^{•-}), o qual reduz o NBT²⁺ (amarelo) a formazan (roxo). Se a SOD estiver presente, ela intercepta o O₂^{•-}, impedindo a formação de formazan, o que origina o aparecimento de bandas acromáticas contra um fundo azul (Li *et al.*, 2018).

Após a eletroforese das amostras em géis de poli(acrilamida) e a incubação em NBT, estes foram transferidos para uma solução de desenvolvimento, na presença ou ausência de cianeto (KCN). O cianeto atua como um inibidor da CuZnSOD, pelo que o gel tratado com cianeto apenas evidenciará a presença de MnSOD (Nakajima *et al.*, 2017). Esta técnica possibilita, assim, o estudo da atividade individual de MnSOD e de CuZnSOD, por comparação com a atividade total da enzima superóxido dismutase, na ausência de cianeto.

Análise da atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

Em condições de estresse oxidativo, a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é rapidamente inativada e a degradação da glicose vai ser realizada pela via das pentoses fosfato, ocorrendo a formação de NADPH em vez de NADH. Assim, a atividade desta enzima em condições de estresse oxidativo, foi avaliada seguindo a formação de NADH a 340 nm. Os valores para cada tratamento foram normalizados em relação ao valor obtido para o respetivo controle.

Carbonilação de proteínas

As amostras foram tratadas com dinitrofenil-hidrazina (DNPH), o qual reage com os grupos carbonilos presentes nas proteínas e é reduzido a dinitrofenol (DNP). As amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF, a qual foi incubada com um anticorpo primário anti-DNP de coelho que se ligou ao DNP presente nas proteínas, e a detecção de grupos carbonilos foi por quimioluminescência. As bandas das amostras na membrana de PVDF foram quantificadas por densitometria e os resultados foram normalizados em relação ao valor obtido para o respetivo grupo controle (sem Menadiona nem H₂O₂).

Quanto a atividade da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase nas diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio e menadiona, foram utilizados os seguintes cálculos:

$$Act. = \frac{\Delta A_{340}/min \times V_t \times TCF}{\epsilon_{340} \times C_a \times V_a}$$

$$Normalização = \frac{Act. Amostra X}{Act. Amostra Controle}$$

Act. = atividade enzimática.

ϵ_{340} = 6.3 mM⁻¹ cm⁻¹.

C_a = concentração de Proteína (µg/µL).

V_a = volume da amostra (µL).

V_t = volume total (L).

TCF = 1.46.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da atividade da superóxido dismutase

As bandas obtidas pela eletroforese das amostras no gel de poliacrilamida sem cianeto (Figura 1) foram quantificadas por densitometria e resultados foram normalizados em relação ao respectivo controle (Figura 2).

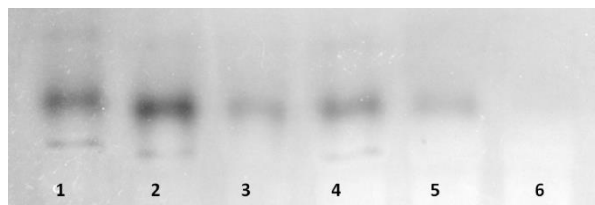


Figura 1. Electroforese em gel de poliacrilamida (7,5% acrilamida) das amostras proteicas. Controle (1 e 4), 2 (Menadiona 0,5), 3 (Menadiona 5,0), 4 (H₂O₂ 0,5) e 5 (H₂O₂ 5,0).

Figure 1. Polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% acrylamide) of the protein samples. Control (1 and 4), 2 (Menadiona 0.5), 3 (Menadiona 5.0), 4 (H₂O₂ 0.5) e 5 (H₂O₂ 5.0).

Na Figura 1, a banda correspondente à enzima MnSOD encontra-se pouco nítida, evidenciando a reduzida atividade desta enzima nestas células, na ausência ou presença de estresse oxidativo. Pela análise dos resultados normalizados evidenciados na Figura 2, verifica-se um aumento da atividade da enzima SOD quando as células são tratadas com uma concentração sub-letal de menadiona, comparativamente ao controle. O tratamento das células com uma concentração letal de menadiona resulta numa diminuição da atividade da SOD em relação ao controle. Esta situação está de acordo com o esperado, indicando que quando as células são sujeitas a um aumento dos níveis de oxidantes exibem uma adaptação, resultando num aumento da atividade das defesas antioxidantes.

Porém, na presença de concentrações letais, as condições de estresse oxidativo induzem uma inibição dos mecanismos celulares, provocando uma diminuição da atividade da SOD (Li et al., 2018).

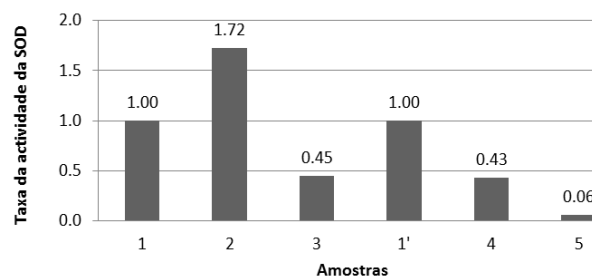


Figura 2. Atividade da Superóxido dismutase (SOD) de diferentes amostras, e o respectivo grupo controle. Controle (1 e 1'), 2 (Menadiona 0,5), 3 (Menadiona 5,0), 4 (H₂O₂ 0,5) e 5 (H₂O₂ 5,0).

Figure 2. Superoxide dismutase activity (SOD) of different samples, and the respective control group. Control (1 and 1'), 2 (Menadiona 0.5), 3 (Menadiona 5.0), 4 (H₂O₂ 0.5) e 5 (H₂O₂ 5.0).

Ao contrário do esperado, concentrações sub-letais de H₂O₂ não resultaram num aumento da atividade da SOD, face ao controle. Apesar deste oxidante não induzir diretamente a atividade da enzima SOD, outros mecanismos moleculares desencadeados pela presença deste oxidante acabam por induzir o aumento da atividade da enzima, o que não é constatado nos resultados obtidos. Tal como anteriormente verificado, o tratamento das células com doses letais de H₂O₂ resultou numa diminuição da atividade da enzima SOD. A diminuição da atividade da enzima CuZnSOD para concentrações letais está relacionada com a oxidação dos seus centros ativos, ocorrendo a libertação de cobre, o qual pode reduzir o H₂O₂ em radical hidroxilo, mais tóxico, pela reação de Fenton (Elias et al., 2010).

Análise da atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da atividade enzimática de GAPDH para os diversos tratamentos. Os valores para cada tratamento foram normalizados em relação ao valor obtido para o respectivo controle (Fig. 3). As concentrações reduzidas de menadiona não parecem induzir efeitos significativos na atividade enzimática de GAPDH, uma vez que as amostras tratadas com menadiona a 0,5 mM apresentaram uma atividade enzimática semelhante ao verificado no grupo controle. Este resultado sugere que nesta concentração o sistema antioxidante das células consegue

atuar contra o estresse oxidativo induzido pela menadiona, como verificado anteriormente com o aumento da atividade enzimática da SOD a esta concentração (Li et al., 2018). Porém, uma concentração de menadiona de 5 mM resultou numa diminuição significativa da atividade enzimática de GAPDH.

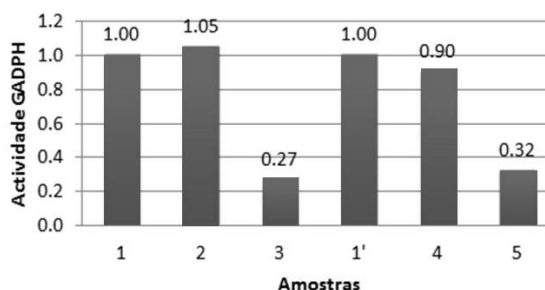


Figura 3. Atividade da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de diferentes amostras, e o respectivo grupo controle. Controle (1 e 1'), 2 (Menadiona 0,5), 3 (Menadiona 5,0), 4 (H₂O₂ 0,5) e 5 (H₂O₂ 5,0).

Figure 3. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) activity of different samples, and the respective control group. Control (1 and 1'), 2 (Menadiona 0.5), 3 (Menadiona 5.0), 4 (H₂O₂ 0.5) e 5 (H₂O₂ 5.0).

Tabela 3. Atividade da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase nas diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio e menadiona.

Table 3. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity at different concentrations of hydrogen peroxide and menadione.

	Amostra	G1	G4
Controle G4	1	-	2 × 10 ⁻⁷
	1'	-	-
Menadiona	2	1,97 × 10 ⁻⁷	1,1
	3	0,5 × 10 ⁻⁷	0,3
H ₂ O ₂	4	-	1,8 × 10 ⁻⁷
	5	-	0,64 × 10 ⁻⁷
Controle G1	1'	1,88 × 10 ⁻⁷	1

A atividade da enzima GAPDH nas amostras tratadas com H₂O₂ a 0,5 mM sofreu uma pequena redução relativamente ao verificado no grupo controle. O tratamento com 5 mM do mesmo oxidante resultou numa diminuição significativa da atividade da enzima. Os resultados obtidos para a atividade da enzima GAPDH em situações de estresse oxidativo comprovam a sensibilidade desta enzima à

ação tóxica dos oxidantes (Nakajima et al., 2017).

Carbonilação de proteínas

As bandas das amostras na membrana de PVDF (Imuno-blot) (Fig. 4) foram quantificadas por densitometria e os resultados foram normalizados em relação ao valor obtido para o respectivo grupo controle (Fig. 5).

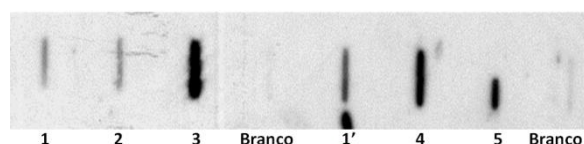


Figura 4. Imuno-blot das diferentes amostras. Detecção de grupos carbonilo resultantes da oxidação de proteínas. Controle (1 e 1'), 2 (Menadiona 0,5), 3 (Menadiona 5,0), 4 (H₂O₂ 0,5) e 5 (H₂O₂ 5,0).

Figure 4. Immunoblot of the different samples. Detection of carbonyl groups resulting from protein oxidation. Control (1 and 1'), 2 (Menadiona 0.5), 3 (Menadiona 5.0), 4 (H₂O₂ 0.5) e 5 (H₂O₂ 5.0).

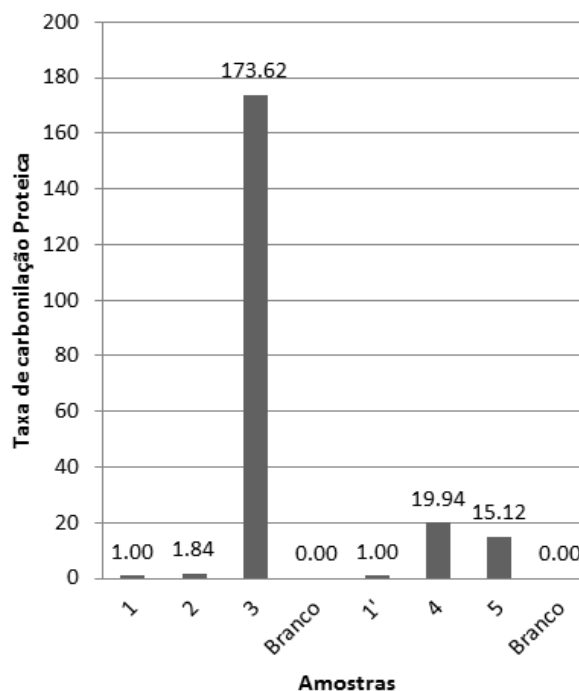


Figura 5. Taxa de carbonilação proteica em diferentes amostras, e o respectivo grupo controle. Controle (1 e 1'), 2 (Menadiona 0,5), 3 (Menadiona 5,0), 4 (H₂O₂ 0,5) e 5 (H₂O₂ 5,0).

Figure 5. Protein carbonylation rate in different samples, and the respective control group. Control (1 and 1'), 2 (Menadiona 0.5), 3 (Menadiona 5.0), 4 (H₂O₂ 0.5) e 5 (H₂O₂ 5.0).

Segundo os resultados obtidos, concentrações sub-letais de menadiona não induzem efeitos significativos na oxidação de proteínas, uma vez que se registou apenas um ligeiro aumento da carbonilação proteica, relativamente ao controle. No entanto, os efeitos oxidativos da menadiona em concentrações letais resultam em danos significativos nas proteínas, verificando-se uma elevada taxa de carbonilação. Este resultado evidencia o poder oxidante da menadiona. Relativamente ao H₂O₂, doses sub-letais deste oxidante resultaram num aumento da carbonilação proteica, mas o tratamento das células com doses letais deste oxidante evidenciou uma diminuição da carbonilação. Este facto mostra uma pequena contrariedade com o esperado, pois, o tratamento das células com concentrações crescentes de oxidantes deveria refletir-se num aumento sucessivo da taxa de carbonilação proteica, de acordo com o efeito dose-resposta (Dalle-Donne et al., 2003).

CONCLUSÃO

O estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogénio e menadiona causa alta redução da atividade de alguns sistemas de defesa antioxidante enzimáticos, o superóxido dismutase e o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), e aumenta a taxa de carbonilação de proteínas em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

REFERÊNCIAS

- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Quim Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BREITENBACH, M.; ECKL, P. Introduction to Oxidative Stress in Biomedical and Biological Research. **Biomolecules**, v. 5, p. 1169–1177, 2015.
- CAETANO, C. C. S. Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em macrófagos murinos após infecção pelo Mayaro virus (Togaviridae). **Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas**, 2016.
- CRIDDLE, D. N.; GILLIES, S.; BAUMGARTNER-WILSON, H. K.; JAFFAR, M.; CHINJE, E. C.; PASSMORE, S.; CHVANOV, M.; BARROW, S.; GERASIMENKO, O. V.; TEPIKIN, A. V.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H. Menadione-induced Reactive Oxygen Species Generation via Redox Cycling Promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40485–40492, 2006.
- DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23–38, 2003.
- DAVIES, K. J. A. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. **IUBMB Life**, v. 50, p. 279–289, 2000.
- DE GROOT, H. Reactive oxygen species in tissue injury. **Hepato-Gastroenterology**, v. 41, p. 328–332, 1994.
- ELIAS, R. J.; WATERHOUSE, A. L. CONTROLLING THE FENTON REACTION IN WINE. **J. Agric. Food Chem**, v. 58, n. 3, p. 1699–1707, 2010.
- FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 18515–18517, 1997.
- GAETANI, G. F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A. M.; KIRKMAN, H. N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v. 73, p. 334–339, 1989.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, p. 231–255, 2004.
- HALLIWELL, B. Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end. **Free Radical Research**, v. 31, p. 261–272, 1999.
- KLINGS, E. S.; FARBER, H. W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. **Resp Res**, v. 2, n. 5, p. 280–285, 2001.
- LANE, N. The Evolution of Oxidative Stress, **Principles of Free Radical Biomedicine**. Volume 1, 1–302, 2011.
- LI, Y.; CHEN, D.; LI, J.; ZHANG, X-X.; WANG, C-F.; WANG, J-M. Changes in superoxide dismutase activity postpartum from Laoshan goat milk and factors influencing its stability during processing. **Italian Journal of Animal Science**, (2018).
- MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**. v. 113, p. 490–495, 1985.

MCCORD, J. M. Iron, free radicals, and oxidative injury. **Seminars in Hematology**, v. 35, p. 5–12, 1998.

NAKAJIMA, H.; ITAKURA, M.; KUBO, T.; KANESHIGE, A.; HARADA, N.; IZAWA, T.; AZUMA, Y-T.; KUWAMURA, M.; YAMAJI, R.; TAKEUCHI, T. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregation Causes Mitochondrial Dysfunction during Oxidative Stress-induced Cell Death. **J Biol Chem**, v. 292, n. 11, p. 4727–4742, 2017.

NAKAZAWA, J.; GENKA, C.; FUJISHIMA, M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. **Japanese Journal of Physiology**, v. 46, p. 15–32, 1996.

POLJSKAK, B.; MILISAV, I. Aging, Oxidative Stress and Antioxidants. **Intech**, p. 321–345, 2013.

RAHMAN, T.; HOSEN, I.; ISLAM, M. M. T.; SHEKHAR, H. U. Oxidative stress and human health. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, p. 997–1019, 2012.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense: relations to oxidative stress. In **Signalling Mechanisms from Transcription Factors to Oxidative Stress**. Springer Verlag, Berlin, p. 165–186, 1995.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem Int Ed Eng**, v. 25, p. 1058–1071. 1986.

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends Cell Biol**. v. 15, p. 319–326, 2005.

TOYKUNI, S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. **Pathology International**, v. 49, p. 91–102. (1999).

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139–162, 1994.